

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/282886826>

A study of cytogenetic stability of induced pluripotent stem cells using karyotyping and comet assay techniques

Article in *Journal of Kerman University of Medical Sciences* · July 2015

CITATIONS

0

READS

32

8 authors, including:



Payam Ghasemi-Dehkordi

Cellular and Molecular Research Center, Sha...

46 PUBLICATIONS 137 CITATIONS

SEE PROFILE



Mehdi Allahbakhshian

Shahid Beheshti University of Medical Sciences

9 PUBLICATIONS 27 CITATIONS

SEE PROFILE



Narges Abdian

Isfahan University of Medical Sciences

16 PUBLICATIONS 60 CITATIONS

SEE PROFILE



Hamideh Jafari Ghahfarokhi

Shahrekord University of Medical Sciences

6 PUBLICATIONS 9 CITATIONS

SEE PROFILE

بررسی پایداری سیتوژنتیکی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) با استفاده از

تکنیک‌های کاریوتایپ و آزمون Comet

پیام قاسمی دهکردی^۱، مهدی اله‌بخشیان فارسانی^۲، نرگس عبدیان^۱، حمیده جعفری قهفرخی^۱، جواد صفاری چالستری^۲، مرضیه صادقیانی^۱، امین میرزائیان^۱، مرتضی هاشم‌زاده چالستری^{۳*}

خلاصه

مقدمه: سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cells یا iPSCs)، قابلیت خودنوزایی نامحدود و تمایز به همه انواع سلول‌ها را در بدن دارا هستند. این سلول‌ها به صورت مصنوعی از یک سلول پرتوان که به طور معمول سلول فیبروبلاست پوستی انسان (HDFs یا Human dermal fibroblasts) می‌باشد، مشتق می‌شوند. بررسی پایداری سیتوژنتیکی این سلول‌ها به منظور مطالعات کاربردی و استفاده از سلول‌های iPS در اهداف درمانی ضروری به نظر می‌رسد.

روش: در مطالعه تجربی حاضر سلول‌های HDF از نمونه‌های پوست ختنه (Foreskin) جدا گردید و کشت داده شد. پایداری سیتوژنتیکی این سلول‌ها در پاساژهای اولیه (پاساژ ۱-۳) با استفاده از آزمون کاریوتایپ و تکنیک Comet مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از تیمار آب اکسیژنه (H_2O_2) بر روی سلول‌های HDF به عنوان کنترل مثبت آزمون Comet قلیایی استفاده شد. سلول‌های iPS با پاساژ پایین (پاساژ ۴-۷) حاصل از برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های HDF بر روی لایه تغذیه کننده شامل سلول‌های فیبروبلاستی جنینی (Mouse embryonic fibroblast یا MEF) کشت داده شد و پایداری سیتوژنتیکی این سلول‌ها با استفاده از آزمون کاریوتایپ و روش Comet قلیایی بررسی گردید.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که سلول‌های iPS در پاساژهای پایین (پاساژ ۴-۷) دارای کاریوتایپ طبیعی (۴۶، XY) بودند و آسیب DNA (Deoxyribonucleic acid) و Comet در این سلول‌ها مشاهده نشد. همچنین سلول‌های HDF در پاساژهای پایین (پاساژ ۱-۳) کاریوتایپ طبیعی (۴۶، XY) نشان دادند، اما ناهنجاری و آسیب DNA در آزمون Comet در مورد گروه شاهد مثبت (سلول‌های HDF با تیمار آب اکسیژنه) مشاهده شد. مقایسه پارامترهای آزمون Comet قلیایی برای سلول‌های iPS و HDF در پاساژهای پایین با گروه شاهد مثبت معنی‌دار بود ($P < 0.05$). نتیجه‌گیری: از آنجایی که آزمون Comet تست حساسی برای یافتن شکست‌های DNA می‌باشد، بهتر است که قبل از انجام آزمایش‌های کاربردی بر روی سلول‌های iPS، پایداری سیتوژنتیکی این سلول‌ها بررسی شود. بدین منظور برای ارزیابی دقیق از آسیب DNA و پایداری سیتوژنتیک سلول‌های iPS هر دو روش کاریوتایپ و Comet می‌تواند مکمل یکدیگر باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs)، سلول فیبروبلاست پوستی انسان (HDF)، آزمون کاریوتایپ، آزمون Comet

۱- پژوهشگر، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۲- استادیار، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۳- پژوهشگر، مرکز تحقیقات یوشیمی بالینی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران ۴- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: biotechnologyskums@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۱۸ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۳/۳/۹ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۴/۲۵

مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی ابتدایی و تمایز نیافته‌ای هستند که پتانسیل تکثیری و تمایزی بالایی دارند و با فعالیت تکثیری خودنوزایی می‌توانند سلول‌های شبیه به خود را ایجاد نمایند (۱). در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در دانش سلول‌های بنیادی با برنامه‌ریزی مجدد (Reprogramming) سلول‌های پیکری بالغ مانند سلول فیبروبلاست به یک سلول بنیادی پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cells یا iPSCs) انجام شده است. تهیه سلول‌های iPS با قابلیت پرتوانی که دارای ویژگی‌های بسیار مشابهی با سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells یا ESCs) هستند، مشکلات اخلاقی ناشی از تهیه سلول‌های ES را ندارد و همچنین امکان رد پیوند این سلول‌ها توسط سیستم ایمنی میزبان به دلیل استفاده از سلول‌های جنینی خود فرد را برطرف می‌سازد (۲).

روش‌های مورد استفاده جهت تولید سلول‌های iPS از سلول‌های پیکری مستلزم تغییرات شگرفی در ساختمان سلول است و می‌تواند حتی ساختمان ژنتیکی سلول منشأ iPS را در طی فرایند برنامه‌ریزی مجدد تحت تأثیر قرار دهد و به همین علت احتمال ناپایداری ژنومی بالا می‌رود (۳-۱). بنابراین استفاده از این سلول‌ها در پزشکی ترمیمی (Regenerative medicine) جهت کاربردهای درمانی و تحقیقاتی به اطمینان از حفظ پایداری و تمامیت ژنومی آن‌ها بستگی دارد. به طور کلی ناهنجاری‌های ژنومی در سطح کروموزومی و تحت کروموزومی (Sub Chromosomal) ممکن است در سلول‌های iPS و مشتقات آن‌ها مشاهده شود که تعدادی از این تغییرات در تعداد کپی از رده سلولی منشأ به ارث می‌رسد؛ در حالی که دیگر تغییرات طی فرایندهای دستکاری ژنتیکی و در طی تمایز رخ می‌دهد (۴، ۲، ۱).

یکی از روش‌های مرسوم انتقال فاکتورهای القا کننده حالت پرتوانی، استفاده از وکتورهای لنتی یا رتروویروس

است که به کارگیری این روش احتمال درج‌شدگی در ژنوم و ناپایداری ژنتیکی را بالا می‌برد (۶-۱). کشت طولانی مدت و پاساژهای متعدد سلول‌های پوستی فیبروبلاست انسانی (Human dermal fibroblasts یا HDFs) و iPS نیز منجر به ناپایداری کروموزوم‌ها می‌شود (۹-۷). با توجه به نکات ذکر شده، سنجش کاربوتایی و تکنیک Comet (Single cell gel electrophoresis) جهت بررسی پایداری ژنتیکی به عنوان یک تست کنترل در طی پاساژهای طولانی سلول‌های HDF و همچنین سلول‌های iPS تولید شده توصیه می‌شود. تکنیک‌های استاندارد که در حال حاضر برای سنجش سیتوژنتیکی سلول‌های بنیادی به کار می‌روند شامل G-banding (Giemsa banding) و یا روش‌هایی بر پایه FISH (Fluorescence in situ hybridization) مانند M-FISH (Multiplex-) و SKY (Spectral karyotyping) هستند که نکته ضروری در هر دو تکنیک، کیفیت و تعداد گستره‌های متافازی به دست آمده می‌باشد (۱۰).

اگرچه تکنیک‌های دیگری همچون CGH array (Comparative genomic hybridization array) و SNP array (Single nucleotide polymorphism array) و تعیین پروفایل بیانی برای بررسی پایداری کروموزومی سلول‌های بنیادی در کشت سلولی وجود دارد، اما پروتکل‌های سیتوژنتیک مولکولی و کلاسیک به عنوان روش‌های پیش‌فرض برای آنالیزهای کاربوتایپ معمولی به کار می‌روند (۱۲، ۱۱). از سوی دیگر، برای حفظ تمامیت ژنوم، سلول‌های iPS نیاز به پاسخ به آسیب‌های DNA (Deoxyribonucleic acid) دارند. شکست‌های رشته DNA (به خصوص شکست‌های دو رشته‌ای) یکی از خطرناک‌ترین آسیب‌های DNA هستند که در صورت عدم ترمیم صحیح منجر به ناپایداری ژنوم سلول می‌شوند (۱۳). بنابراین بررسی سلول‌های iPS از نظر آسیب به DNA و بررسی پایداری ژنومی ضروری است. با استفاده از G-banding حاصل از آزمایش کاربوتایپ می‌توان

اتمام گرمخانه‌گذاری، محیط رویی خارج و دوباره ۵ میلی‌لیتر محلول Trypsin-EDTA ۰/۲۵ درصد به رسوب اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آنزیم مورد استفاده با FBS (Fetal bovine serum) خنثی گردید. سوسپانسیون سلولی به دست آمده پس از ورتکس، از فیلتر مش ۴۵ میکرومتر عبور داده شد و سلول‌های به دست آمده پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه در محیط DMEM حاوی ۲۰ درصد FBS مخلوط گردید و در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت میزان چسبندگی بررسی شد و سلول‌ها ۴ تا ۵ روز پس از جداسازی آماده اولین پاساژ شدند (۴).

آماده‌سازی سلول‌های HDF

سلول‌های HDF کشت شده در پاساژهای پایین (پاساژ ۳-۱) در شرایط آزمایشگاهی ابتدا با PBS دو بار شستشو و با محلول Trypsin-EDTA ۰/۰۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه از کف ظرف کشت جدا شدند. سپس آنزیم توسط DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS خنثی گردید. سلول‌های HDF با کمک لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ شمارش شد. سپس سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه‌ای به تعداد $10^3 \times 150$ سلول برای هر چاهک (Well) حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM حاوی FBS ۱۵ درصد در انکوباتور دی‌اکسید کربن و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰-۹۰ درصد برای هر چاهک، DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد برای هماهنگ‌سازی شرایط به سلول‌ها افزوده شد. بعد از ۴۸ ساعت، سلول‌های HDF برای آزمون‌های کاربوتایپ و Comet آماده شدند.

به بررسی اضافه شدگی‌ها (Insertions)، حذف‌ها (Deletions)، مضاعف شدگی‌ها (Duplications)، وارونگی‌ها (Inversions) و جابجایی‌های کروموزوم‌ها پرداخت. آزمون Comet یک روش ساده، حساس و سریع برای اندازه‌گیری شکست‌های رشته DNA در سلول‌های یوکاریوتی است (۱۴).

حساسیت بالا، مشاهده و تعیین آسیب در تک‌تک سلول‌ها در همه مراحل چرخه سلولی از جمله مزیت‌های آزمون Comet در برابر سایر روش‌های ارزیابی آسیب‌های DNA می‌باشد (۱۵). به دلیل مزایای ویژه آزمون Comet، استفاده از این آزمون روز به روز گسترش یافته است. از این‌رو، در مطالعه حاضر تمامیت ژنتیکی سلول‌های iPS با استفاده از دو تکنیک کاربوتایپ و Comet مورد بررسی قرار گرفت تا احتمال بروز ناهنجاری‌های سیتوژنتیک و ژنتیکی که می‌توانند منجر به بروز بدخیمی در سلول برنامه‌ریزی شده شوند، مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش بررسی

جداسازی سلول‌های HDF از نمونه‌های پوست ختنه

(Foreskin)

در این مطالعه تجربی ابتدا نمونه‌های Foreskin تهیه شده از بیمارستان کاشانی شهرکرد در محیط انتقال (Transfer media) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین G و استرپتومایسین به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس نمونه Foreskin در یک پلیت ۱۰ سانتی‌متری قرار گرفت و به مدت ۱ دقیقه با الکل ۷۰ درصد شستشو و سپس به پلیت جدید منتقل گردید. پس از آن ۲-۳ بار با فسفات بافر سالین (Phosphate buffered saline) یا PBS شستشو و به قطعات کوچک‌تر برش داده شد. قطعات پوست به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در محلول Trypsin-EDTA (Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۲۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از

تولید وکتورهای لنتی ویروسی جهت برنامه ریزی مجدد سلول‌های HDF

در مطالعه حاضر طبق روش ارایه شده توسط Yamanaka و همکاران (۴)، از وکتورهای پلاسمیدی لنتی ویروسی TetO-FUW-OSKM حاوی ژن‌های OCT-3/4، SOX-2، KLF4 و C-MYC، psPAX و PMD2 از آزمایشگاه‌های Trono و Rudolf Jaenisch استفاده شد. به منظور برنامه ریزی مجدد، سلول‌های HDF جهت بسته‌بندی اجزا و تولید وکتورهای لنتی ویروسی سلول‌های HEK-293T (Human embryonic kidney-293T) جدا شده از کلیه جنین انسانی مورد استفاده قرار گرفت (۱۶، ۴).

انتقال (Transduction) وکتورهای لنتی ویروسی تولید شده به سلول‌های HDF

ابتدا تعداد $10^6 \times 5$ سلول HDF به هر کدام از خانه‌های یک پلیت ۶ خانه‌ای انتقال یافت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت داده شد. پس از رسیدن تراکم سلول‌های HDF به ۷۰ درصد، ۲۰۰ میکرولیتر از ویروس‌های تولید شده به سلول‌های کشت داده شده اضافه گردید و به مدت ۱۲-۸ ساعت در انکوباتور دارای دی‌اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس محیط رویی سلول‌ها با محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS تعویض گردید. همچنین برای تأیید انجام این انتقال، از یک وکتور لنتی ویروسی pWXLd که فقط حاوی GFP (Green fluorescent protein) بود، به عنوان کنترل استفاده شد.

پس از ۴۸ ساعت، با جداسازی RNA (Ribonucleic acid) و تولید cDNA (Copy DNA)، بیان ژن‌های مورد نظر به روش RT-PCR (Real time-Polymerase chain reaction) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. پس از چند روز، سلول‌های HDF انتقال داده شده جهت تولید سلول‌های iPS بر روی سلول‌های لایه تغذیه کننده MEF (Mouse embryonic fibroblast) (سلول‌های

غیر فعال شده با میتومایسین C) حاوی محیط DMEM-F12 و دارای KSR (Knockout serum replacement)، فاکتورهای رشد (bFGF)، گلوتامین و اسیدهای آمینه غیر ضروری (Non-essential amino acids یا NEAA) قرار گرفتند و محیط کشت آن‌ها به صورت روزانه تعویض گردید (۴). پس از رسیدن کلونی‌های iPS به تراکم مناسب، جهت آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون کاربوتایپ

آنالیز کاربوتایپ با استفاده از روش G-banding بر روی سلول‌های HDF در پاساژهای پایین (پاساژ ۳-۱) و بعد از برنامه ریزی مجدد این سلول‌ها (منتقل کردن با وکتورهای لنتی ویروسی) به منظور تولید سلول‌های iPS صورت پذیرفت. هنگامی که تراکم سلول‌ها به ازای هر چاهک به غلظت ۸۰-۹۰ درصد رسید، محیط رویی سلول‌ها با محیط حاوی محلول ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر Karyomax Colcemid® (Cat. No. 15212-012, Invitrogen) تعویض گردید و سپس پلیت سلولی به انکوباتور دی‌اکسید کربن برگردانده شد. سلول‌ها پس از ۲۰ دقیقه جمع‌آوری و ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۷۵ مولار کلرید پتاسیم به آن اضافه گردید. سوپانسیون حاصل شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. بعد از آن ۱ میلی‌لیتر محلول Camoy's fixative سرد (شامل متانول و اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) به سوپانسیون اضافه و سلول‌ها با سرعت ۹۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق سانتریفوژ و رسوب سلولی جمع‌آوری گردید.

پس از انجام دو مرحله تثبیت (شامل اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر مواد تثبیت کننده و سانتریفوژ در سرعت ۹۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه)، رسوب سلولی با ۲۰۰ میکرولیتر مواد تثبیت کننده سرد مخلوط و سلول‌های هر سوپانسیون بر روی اسلاید شیشه‌ای توزیع شد و به مدت ۳

سانتی گراد پوشیده و اجازه داده شد تا کامل منجمد شود. قبل از سفت شدن آگارز، لامل (Coverslip) بر روی آن گذاشته شد و اسلایدها بر روی یخ قرار گرفتند. رسوب‌های سلولی آماده شده طبق دستورالعمل ذکر شده در ۸۰ میکرولیتر آگارز با دمای ذوب پایین (Low melting agarose یا LMA) و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد دوباره معلق شدن. پس از خارج کردن آرام لامل‌ها، سوسپانسیون سلولی به سرعت بر روی لایه آگارز اول پیپت شدند و لامل‌ها بر روی آن قرار داده شد و اسلایدها به منظور سفت شدن آگارز بر روی یخ قرار گرفتند. لامل‌ها را به آرامی برداشته، بر روی آن ۲۵۰-۳۰۰ میکرولیتر آگارز ۰/۱ درصد دارای نقطه ذوب طبیعی به عنوان سومین لایه ریخته شد.

پس از برداشتن لامل‌ها، اسلایدها به سرعت در محلول لیز کننده سرد تازه آماده شده [شامل ۲/۵ مولار کلرید سدیم، ۱۰۰ میلی مولار Na₂EDTA، ۱۰ میلی مولار Tris با pH برابر با ۱۰ به همراه ۱ درصد Triton X-100 و ۱۰ درصد DMSO (Dimethyl sulfoxide)] غوطه‌ور شدند و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از لیز شدن، اسلایدها در تانک ژل الکتروفورز افقی قرار داده شدند. تانک با محلول تازه و سرد بافر الکتروفورز (۳۰۰ میلی مولار Na₂EDTA و ۱ میلی مولار NaOH با pH > ۱۳) تا سطح تقریبی ۰/۲۵ سانتی متر بالای اسلایدها پر شد. اسلایدها در بافر قلیایی به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شدند تا باز شدن دو رشته DNA رخ دهد. الکتروفورز در ولتاژ ۲۵ ولت (۰/۶۶ ولت بر سانتی متر) و ۳۰۰ میلی آمپر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام گردید. پس از الکتروفورز اسلایدها خشک شده، روی یک سینی قرار گرفتند. جهت حذف قلیاها و دترجنت‌ها، اسلایدها به آرامی طی سه مرحله در بافر خنثی کننده (۰/۴ Tris ۷/۵ pH) به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور و در یک مرحله با اتانول ۹۵ درصد شسته شدند. اسلایدها خشک شدند و تا قبل از تجزیه و تحلیل در

ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در نهایت، آنالیز معمول G-banding کروموزوم‌ها انجام شد و به ازای هر اسلاید ۲۰ کاریوتایپ مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون Comet (Comet assay)

به منظور انجام آزمون Comet، از تیمار آب اکسیژنه (H₂O₂) بر روی سلول‌های سالم HDF به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. سلول‌ها در پلیت‌های چند خانه‌ای حاوی ۲ میلی لیتر محیط DMEM با غلظت ۱۰۳ × ۱۵۰ سلول در میلی لیتر و سپس در محیط غنی شده با ۱۰ درصد FBS، ۲ میلی مولار گلوتامین، ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کشت داده شدند و اجازه داده شد تا سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در انکوباتور دی اکسید کربن به کف پلیت چسبیده و تکثیر یابند. به منظور ایجاد آسیب‌های تک رشته‌ای DNA، روی سلول‌ها با محیط DMEM حاوی ۵۰ میکرومولار آب اکسیژنه به مدت ۳۰ دقیقه جایگزین گردید. سپس محیط‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. در پایان گرمخانه گذاری سلول‌ها جمع آوری شده، به عنوان شاهد مثبت (آسیب DNA) در آزمون Comet مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون Comet قلیایی طبق دستورالعمل استاندارد ذکر شده توسط McKelvey-Martin و همکاران (۱۷) با اندکی تغییرات بر روی سلول‌های HDF سالم در پاساژهای پایین (پاساژ ۱-۳) و همچنین بر روی سلول‌های iPS پاساژ پایین (پاساژ ۴-۷) صورت پذیرفت. به منظور خروج پروتئین‌ها، تمام اسلایدها با استفاده از متانول شسته شده، با کمک شعله حرارت داده شدند. اسلایدهای میکروسکوپی Dakin با ۳۰۰ میکرولیتر آگارز ۰/۱ درصد دارای نقطه ذوب طبیعی (Carlsbad, Ca, USA) آماده شده در PBS و در دمای ۵۰ درجه

نتایج

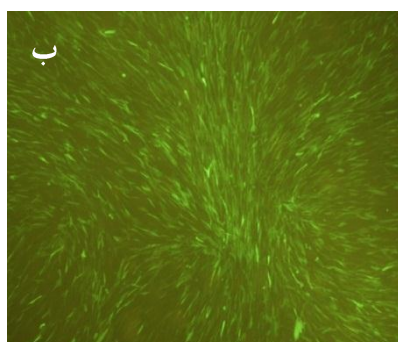
آماده سازی سلول های HDF

به منظور ارزیابی پایداری سیتوژنتیکی و خصوصیات کاریوتایپ، ابتدا سلول های HDF جدا شده از نمونه های Foreskin در پاساژ پایین (سلول های سالم) با استفاده از تست کاریوتایپ و آزمون Comet مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۱ نشان دهنده سلول های HDF جدا شده از نمونه های Foreskin انسانی در پاساژهای پایین (سلول های سالم) می باشد.



شکل ۱. سلول های HDF (Human dermal fibroblasts) جدا شده از نمونه های Foreskin/انسان در پاساژ پایین (پاساژ ۳)

الف). همچنین وکتورهای لنتی ویروسی حاوی ژن بیان کننده GFP پس از انتقال، میزان بالایی از سلول های HDF را آلوده کردند (شکل ۲، قسمت ب).

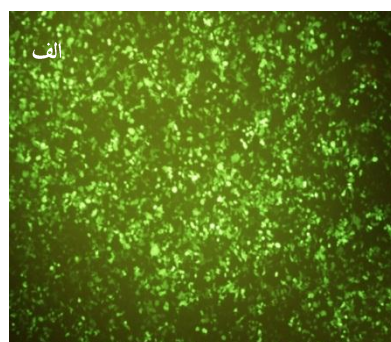


۲ میکروگرم بر میلی لیتر اتیدیوم بروماید در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بررسی اسلایدها در زیر پرتو فرابنفش انجام شد.

هر آزمایش حداقل سه بار تکرار گردید. داده های حاصل از تمام آزمایش ها در نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ (version 17 SPSS, Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پارامترهای آزمون Comet قلیایی توسط نرم افزار CaspLab نسخه 1.0.0 و واریانس های درون گروه ها توسط آزمون ANOVA محاسبه شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

انتقال سلول های HDF با وکتورهای لنتی ویروسی

یافته ها بیانگر تولید موفقیت آمیز وکتورهای لنتی ویروسی در رده سلولی HEK-293T بود (شکل ۲، قسمت



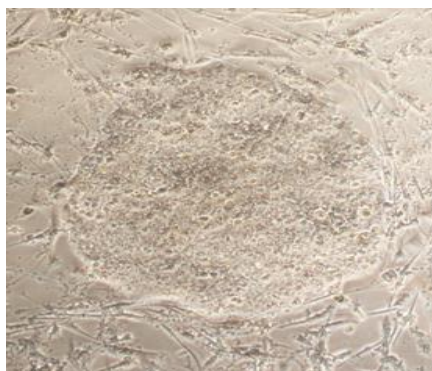
شکل ۲. تولید رنگ سبز فلورسنت ناشی از بیان GFP (Green fluorescent protein) در زیر میکروسکوپ فلورسنت، سلول های HEK-293T

(Human embryonic kidney-293T) در حال تولید ویروس (قسمت الف) و سلول های HDF (Human dermal fibroblasts) پس از انتقال (قسمت ب)

آماده‌سازی سلول‌های iPS

سلول‌های iPS کشت داده شده بر روی لایه تغذیه کننده MEF در پاساژهای پایین جهت ارزیابی پایداری سیتوژنتیکی

و همچنین خصوصیات کروموزومی با استفاده از دو تکنیک کاریوتایپ و آزمون Comet مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۳).

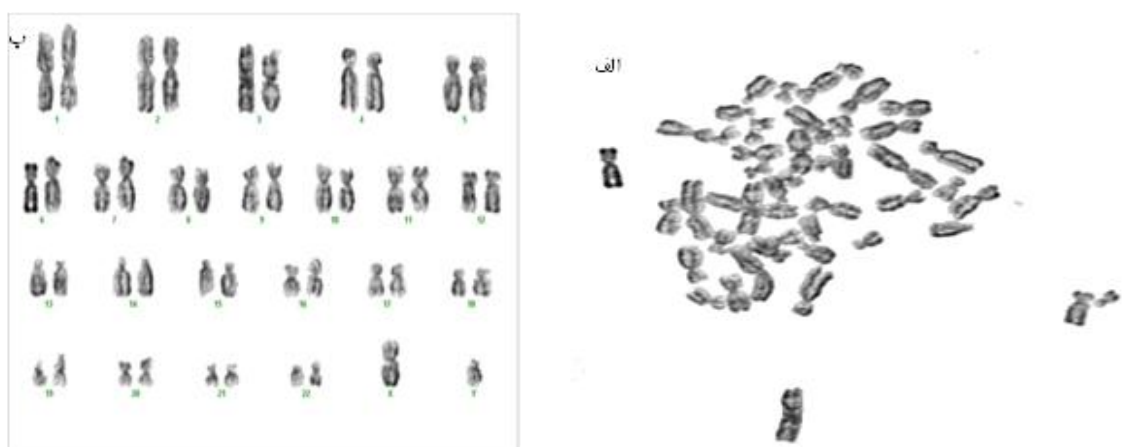


شکل ۳. سلول‌های iPS (Induced pluripotent stem) کشت داده شده بر روی لایه تغذیه کننده MEF (Mouse embryonic fibroblast) در پاساژ پایین (پاساژ ۵)

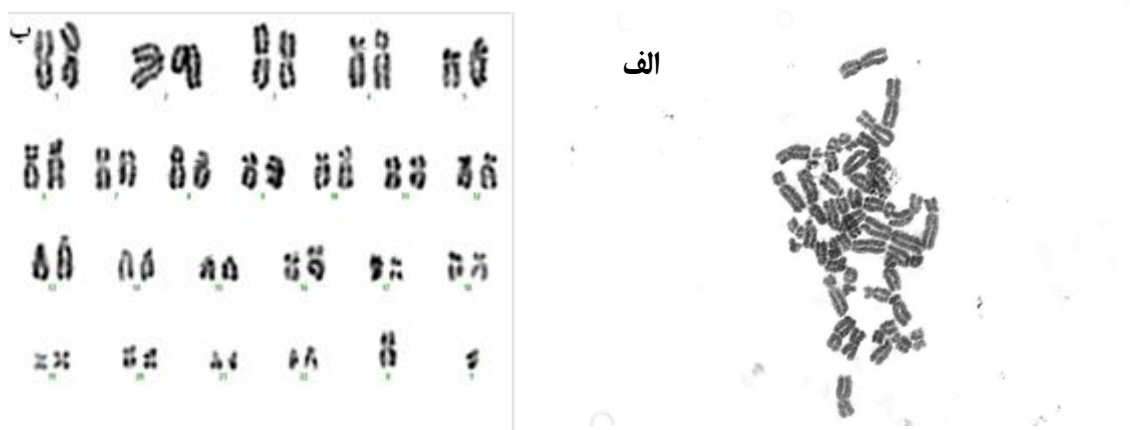
آنالیز کاریوتایپ

روش G-banding به منظور تعیین کاریوتایپ سلول‌های HDF در پاساژهای پایین انجام شد. آنالیز کاریوتایپ نشان داد که سلول‌های HDF در پاساژهای پایین (پاساژ ۱-۳) دارای کاریوتایپ طبیعی (۴۶XY) می‌باشند (شکل ۴،

قسمت الف و ب). نتایج آزمون کاریوتایپ بر روی سلول‌های iPS پاساژ پایین (پاساژ ۷-۴) نیز نشان دهنده کاریوتایپ طبیعی (۴۶ کروموزوم) در آنها بود و هیچ نوع ناهنجاری در این سلول‌ها مشاهده نگردید (شکل ۵، قسمت الف و ب).



شکل ۴. متافاز (قسمت الف) و کاریوتایپ (قسمت ب) سلول‌های HDF (Human dermal fibroblasts) در پاساژ پایین



شکل ۵. متافاز (قسمت الف) و کاریوتایپ (قسمت ب) سلول‌های iPS (Induced pluripotent stem) پاساژ پایین

نتایج آزمون Comet

آزمون Comet قلیایی بر روی سلول‌های HDF (شاهد مثبت) که تحت تأثیر تیمار آب اکسیژنه قرار گرفته بودند، انجام شد (شکل ۴، قسمت الف). نتایج این آزمون بر روی سلول‌های HDF سالم در پاساژهای اولیه (پاساژ ۱-۳) هیچ

گونه آسیب DNA و شکست‌های تک رشته‌ای DNA را نشان نداد (شکل ۴، قسمت ب). آزمون Comet همچنین بر روی سلول‌های iPS در پاساژهای پایین هیچ نوع Comet و آسیب DNA را نشان نداد. (شکل ۴، قسمت ج).



شکل ۶. تأثیر تیمار آب اکسیژنه به عنوان شاهد مثبت جهت آسیب DNA (Deoxyribonucleic acid) در پاساژهای پایین سلول‌های HDF (Human dermal fibroblast) پس از آزمون Comet (قسمت الف)، آزمون Comet قلیایی بر روی سلول‌های HDF در پاساژ پایین و داشتن سلول‌های طبیعی و بدون آسیب DNA (قسمت ب)، آزمون Comet قلیایی بر روی سلول‌های iPS (Induced pluripotent stem) در پاساژ پایین و عدم وجود آسیب در ساختمان DNA (قسمت ج)

پایین) و سلول‌های iPS توسط نرم‌افزار CaspLab نسخه 1.0.0 برای بررسی وضعیت سیتوژنتیکی سلول‌ها انجام شد (جدول ۱).

در مطالعه حاضر، ارتباط پارامترهای Head area، Tail area، Tail moment و Comet length، Tail length، Tail DNA، Head DNA بر روی سلول‌های شاهد مثبت (سلول‌های HDF تحت تیمار با آب اکسیژنه)، شاهد منفی (سلول‌های HDF با پاساژ

جدول ۱. جزئیات آزمون Comet قلبایی بر روی سلول‌های iPS و گروه شاهد مثبت (سلول‌های HDF در معرض تیمار با آب اکسیژنه)

| سلول‌های سالم HDF (پاساژ ۱-۳) | سلول‌های iPS (پاساژ ۷-۸) | سلول‌های HDF تحت تیمار با آب اکسیژنه | پارامترها |
|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------|
| تعداد = ۱۰۰ سلول | تعداد = ۸۰ سلول | تعداد = ۵۵ سلول | |
| میانگین \pm انحراف معیار | میانگین \pm انحراف معیار | میانگین \pm انحراف معیار | |
| ۱۵۱۲/۲۲۰ \pm ۷۲۵/۸۵۴ | ۱۱۴۹/۲۰۰ \pm ۳۶۹/۱۰۴ | ۱۶۰۲/۶۶۰ \pm ۱۵۱۱/۷۱۲ | Head area |
| ۱۰۲/۷۵۰ \pm ۹۹/۱۵۸ | ۶۱/۹۹۰ \pm ۷۲/۶۵۶ | ۴۷۷۹/۳۶۰ \pm ۱۷۵۲/۷۶۸ | Tail area |
| ۲۰۹/۲۷۱ \pm ۱۰۱/۵۳۳ | ۱۰۸/۵۳۹ \pm ۴۷/۰۰۵ | ۱۷۱/۱۴۹ \pm ۱۹۸/۴۱۱ | Head DNA |
| ۳/۶۳۱ \pm ۴/۱۳۷ | ۱/۵۱۲ \pm ۲/۲۵۶ | ۳۶۳/۹۱۶ \pm ۱۷۸/۳۶۸ | Tail DNA |
| ۹۸/۲۵۷ \pm ۱/۸۰۰ | ۹۸/۷۶۵ \pm ۱/۴۲۱ | ۲۹/۱۷۸ \pm ۷/۶۹۰ | Head DNA% |
| ۱/۷۴۳ \pm ۱/۸۰۰ | ۱/۲۳۵ \pm ۱/۴۲۱ | ۷۰/۸۰۰ \pm ۷/۶۹۰ | Tail DNA% |
| ۳/۴۴۰ \pm ۰/۹۷۵ | ۳/۷۱۰ \pm ۱/۴۳۶ | ۸۰/۵۹۰ \pm ۲۰/۶۶۰ | Tail length |
| ۴۸/۴۶۰ \pm ۹/۷۸۴ | ۴۳/۰۷۰ \pm ۶/۵۷۴ | ۱۲۴/۶۸۰ \pm ۲۵/۷۳۳ | Comet length |
| ۰/۰۶۸ \pm ۰/۰۸۰ | ۰/۰۵۶ \pm ۰/۰۸۷ | ۵۷/۸۴۰ \pm ۱۸/۷۵۰ | Tail moment |

Head area: ناحیه سر Comet، Tail area: محدوده دنباله Comet، Head DNA: مقدار DNA در سر Comet، Tail DNA: مقدار DNA در دنباله Comet، Comet length: طول دنباله Comet محاسبه شده از حاشیه سمت راست Head area تا انتهای دنباله Comet، Comet length: طول کل Comet از حاشیه سمت چپ Head area تا انتهای دم Comet، Tail moment: درصد DNA در دم Comet \times طول دم Comet

HDF: Human dermal fibroblasts; iPS: Induced pluripotent stem

iPS و سلول‌های HDF در پاساژهای پایین و گروه سلول‌های HDF با تیمار آب اکسیژنه (شاهد مثبت) توسط آزمون ANOVA نشان دهنده تفاوت معنی‌دار میان پارامترها بود ($P < ۰/۰۵$).

واریانس بین گروه‌ها توسط آزمون ANOVA بررسی شد (جدول ۲). مقایسه پارامترهای Head area، Tail area، Head DNA (درصد)، Tail DNA (درصد)، Tail length، Comet length و Tail moment آزمون Comet و آنالیز واریانس بین سلول‌های

جدول ۲. مقایسه پارامترهای آزمون Comet قلبایی بین پاساژهای پایین سلول‌های iPS و سلول‌های سالم HDF با گروه شاهد مثبت (تیمار با آب اکسیژنه)

| پارامترها | اختلاف میانگین \pm خطای استاندارد | P (آزمون ANOVA) |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| مقایسه پاساژهای پایین سلول‌های iPS با گروه شاهد مثبت (تیمار با آب اکسیژنه) | | |
| Head area | $471/599 \pm 121/780$ | ۰/۰۱۱ |
| Tail area | $4583/101 \pm 190/087$ | < ۰/۰۰۱ |
| Head DNA% | $64/372 \pm 15/987$ | ۰/۰۰۷ |
| Tail DNA% | $69/181 \pm 0/850$ | < ۰/۰۰۱ |
| Tail length | $75/521 \pm 2/464$ | < ۰/۰۰۱ |
| Comet length | $80/410 \pm 2/856$ | < ۰/۰۰۱ |
| Tail moment | $56/430 \pm 2/093$ | < ۰/۰۰۱ |
| مقایسه سلول‌های سالم HDF با گروه شاهد مثبت (تیمار با آب اکسیژنه) | | |
| Head area | $727/876 \pm 109/743$ | ۰/۰۱۱ |
| Tail area | $8401/250 \pm 171/300$ | < ۰/۰۰۱ |
| Head DNA% | $86/900 \pm 0/766$ | < ۰/۰۰۱ |
| Tail DNA% | $-86/900 \pm 0/766$ | < ۰/۰۰۱ |
| Tail length | $-112/560 \pm 2/220$ | < ۰/۰۰۱ |
| Comet length | $-100/197 \pm 2/570$ | < ۰/۰۰۱ |
| Tail moment | $102/177 \pm 1/890$ | < ۰/۰۰۱ |

HDF: Human dermal fibroblasts; iPS: Induced pluripotent stem

بحث

بررسی‌های اخیر با برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های بالغ پیکری و تبدیل این سلول‌ها به سلول‌های iPS، فرصت‌های استثنایی را برای پیشرفت‌های چشمگیر در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی فراهم آورده است (۲۵-۱۷). از آنجایی که فرایند تولید سلول‌های iPS در بیشتر موارد با دستکاری ژنتیکی سلول‌های منشأ همراه است، بنابراین از همان ابتدای انجام تحقیقات بر روی این سلول‌ها، بررسی‌های ژنتیکی جهت تأیید سلامت آن‌ها مورد توجه قرار گرفت. به همین منظور در مطالعه حاضر آزمون Comet و کاربوتایپ بر روی سلول‌های iPS در جهت تعیین هر گونه ناهنجاری کروموزومی و ناپایداری ژنومی در پاساژهای پایین انجام شد. در تحقیق حاضر از تیمار آب اکسیژنه به منظور القای آسیب به DNA

بر روی محیط کشت سلول‌های HDF به عنوان نمونه شاهد مثبت در آزمون Comet استفاده گردید که آسیب به DNA و Comet مشاهده شد. از طرف دیگر، آزمون Comet کاربوتایپ بر روی سلول‌های HDF سالم در پاساژهای پایین (پاساژ ۳-۱) هیچ گونه آسیب DNA و ناهنجاری کروموزومی را نشان نداد. آنالیز پایداری سیتوژنتیکی سلول‌های HDF و iPS در پاساژ پایین در مقایسه با گروه شاهد مثبت (تیمار آب اکسیژنه) توسط آزمون ANOVA برای پارامترهای Head area، Tail area، Head DNA%، Tail DNA%، Tail length، Comet length و Tail moment به طور معنی‌داری متفاوت بود ($P < 0/05$).

از مطالعات انجام شده در زمینه بررسی آسیب‌های سیتوژنتیکی سلول‌های بنیادی می‌توان به مطالعه Maynard و همکاران (۱۸) اشاره کرد. آنان با استفاده از تکنیک Comet

بالای ناهنجاری‌های ژنتیکی همچون افزایش تعداد کروموزوم X (هر دو کروموزوم X فعال و غیر فعال) در پاساژهای بالا (پاساژهای ۱۰ و بالاتر) باشند (۲۸).

Laurent و همکاران فراوانی بالایی از انواع تعداد کپی Sub کروموزومی را در بررسی بر روی ۱۸۶ رده سلولی iPS که شامل سلول‌های ES و iPS انسانی بود، شناسایی کردند و مشخص شد که فرایند برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای در سلول‌های iPS با شیوع بالای حذف ژن‌های سرکوبگر تومور و مدت کشت و دو تا شدن ژن‌های انکوژنی همراه است (۲۹). آن‌ها نشان دادند که افزایش تعداد حذف شدگی‌ها مربوط به ژن‌های سرکوبگر تومور می‌باشد؛ در حالی که دو تا شدن انکوژن‌ها در سلول‌های iPS که برای مدت طولانی کشت داده شده‌اند، مشاهده می‌شود (۲۹).

مطالعات همچنین ناهنجاری‌های ژنومی مانند آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی، جابه‌جاشدن، نسخه‌برداری‌هایی در حد مگا باز، حذف‌ها و جهش‌های نقطه‌ای را در سلول‌های iPS نشان داده‌اند (۳۰). در مطالعه Hussein و همکاران مشاهده شد که سلول‌های iPS انسانی با پاساژهای اولیه در مقایسه با سلول‌های iPS با پاساژ میانی و فیبروبلاست‌ها یا سلول‌های ES دارای تعداد بیشتری واریانت با افزایش تعداد کپی (Copy-number variations) یا CNVs هستند. برخی از این اختلالات شامل شیوع بالای نسخه‌برداری‌های کروموزوم ۱۲ است که نتیجه آن تولید بیش از حد فاکتورهای Nanog و GDF-3 (Growth differentiation factor-3) می‌باشد و ممکن است به فرایند سازگاری در طی برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای کمک کند (۳۱).

ال‌بخشیان فارسانی و همکاران با انجام آزمون‌های Comet و کاریوتایپ بر روی سلول‌های HDF پاساژ پایین (پاساژ ۱-۳) و پاساژ بالا (پاساژ ۷-۴) نشان دادند که سلول‌های HDF در پاساژهای بالا و پایین دارای کاریوتایپ طبیعی می‌باشند. همچنین پارامترهای آزمون Comet قلیایی بر روی

نشان دادند که سلول‌های ES در مقایسه با سلول‌های MEF کارایی بالاتری در ترمیم انواع مختلف آسیب‌های DNA دارند. آنالیزهای Microarray بیان ژنی نشان داد که سطح mRNA (Messenger RNA) چندین ژن ترمیم DNA در سلول‌های ES در مقایسه با اشکال تمایز یافته، افزایش داشته است. مطالعه Maynard و همکاران بیان کردند که مسیرهای حفظ ژنومی در سلول‌های ES در مقایسه با سلول‌های تمایز یافته انسانی افزایش پیدا کرده است (۱۸).

Ponzinibbio و همکاران آسیب با تأخیر DNA ناشی از اشعه یونیزان در فیبروبلاست‌های انسانی MRC-5 را در شرایط کشت آزمایشگاهی مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. مطالعه آن‌ها نشان داد که دوزهای کم پرتو یونیزان (۵۰-۱۰ میلی‌گری) می‌تواند آسیب‌های تأخیری را القا کند. همچنین روش Comet، آنالیز میکرونوکلئوس و تجزیه و تحلیل تمرکز γ -H2AX تکنیک‌های مفیدی جهت تشخیص آسیب DNA و همچنین روش‌های حساسی برای مطالعه وقایع تأخیری ناپایداری ژنومی می‌باشند (۲۶).

Minina و همکاران با انجام مطالعات بر روی دو رده سلولی iPS و دو رده سلولی بنیادی جنینی موش، مونوزومی کروموزوم X را در کل رده‌های سلولی مورد بررسی گزارش کردند. همچنین ناپایداری کروموزومی (آنیوپلوئیدی) در هر دو رده سلولی iPS مشاهده شد. علاوه بر این، در یکی از لاین‌های سلولی iPS بازآرایی‌های کروموزومی و قطعات کروموزومی وجود داشت (۲۷). Chen و همکاران در تحقیق خود به بررسی خواص بیولوژی، پایداری سیتوژنتیکی و تعداد کروموزوم‌های X غیر فعال سلول‌های HDFs جنس مؤنث در طی دوره رشد سلولی پاساژهای طولانی مدت پرداختند. آن‌ها نتوانستند کاریوتایپ غیر طبیعی این سلول‌ها را با روش G-banding نشان دهند، اما یافته‌های آن‌ها نشان داد که سلول‌های HDFs جنس مؤنث کشت داده شده می‌توانند در معرض خطر

پژوهش‌های آتی استفاده کرد. بنابراین با توجه به نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌گردد که برای بررسی دقیق، سریع و حساس ناپایداری سیتوژنتیکی و آسیب به DNA بر روی سلول‌های iPS، هر دو تکنیک کاریوتایپ و Comet قلیایی با هم به کار رود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد (شماره گرانت: ۹۱-۱۰-۵) و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی این دانشگاه به منظور فراهم نمودن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پروژه تحقیقاتی اعلام می‌نمایند.

سلول‌های HDF پاساژ پایین در مقایسه با سلول‌های HDF پاساژهای بالا و نمونه شاهد مثبت (سلول‌های HDF سالم تحت تیمار با اشعه گاما) به طور معنی‌داری متفاوت بود و آسیب DNA و Comet در سلول‌های HDF با پاساژهای بالا شبیه به نمونه شاهد مثبت (تیمار با اشعه گاما) مشاهده گردید (۳۲).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده، آزمون‌های کاریوتایپ و Comet قلیایی در بررسی‌های سیتوژنتیکی سلولی می‌توانند مکمل یکدیگر باشند. همچنین نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن بود که پاساژهای پایین سلول‌های iPS (پاساژ ۴-۷) از لحاظ سیتوژنتیکی پایدار هستند و از آنها می‌توان در

References

- Corrales NLL, Mrasek K, Voigt M, Liehr T, Kosyakova N. Comprehensive characterization of genomic instability in pluripotent stem cells and their derived neuroprogenitor cell lines. *Applied & Translational Genomics* 2012; 1: 21-4.
- Chen Z, Zhao T, Xu Y. The genomic stability of induced pluripotent stem cells. *Protein Cell* 2012; 3(4): 271-7.
- Grandela C, Wolvetang E. hESC Adaptation, selection and stability. *Stem Cell Reviews* 2007; 3(3): 183-91.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 381-4.
- Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(1): 189-93.
- Martins-Taylor K, Xu RH. Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012; 30(1): 22-7.
- Lake BB, Fink J, Klemetsaune L, Fu X, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Context-dependent enhancement of induced pluripotent stem cell reprogramming by silencing Puma. *Stem Cells* 2012; 30(5): 888-97.

9. Sarig R, Rivlin N, Brosh R, Bornstein C, Kamer I, Ezra O, et al. Mutant p53 facilitates somatic cell reprogramming and augments the malignant potential of reprogrammed cells. *J Exp Med* 2010; 207(10): 2127-40.
10. Moralli D, Yusuf M, Mandegar MA, Khoja S, Monaco ZL, Volpi EV. An improved technique for chromosomal analysis of human ES and iPS cells. *Stem Cell Rev* 2011; 7(2): 471-7.
11. Elliott AM, Elliott KA, Kammesheidt A. High resolution array-CGH characterization of human stem cells using a stem cell focused microarray. *Mol Biotechnol* 2010; 46(3): 234-42.
12. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(4): 521-31.
13. Fan J, Robert C, Jang YY, Liu H, Sharkis S, Baylin SB, et al. Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining. *Mutat Res* 2011; 713(1-2): 8-17.
14. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26(3): 249-61.
15. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 722(1-2): 225-54.
16. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; 25(10): 1177-81.
17. McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, et al. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* 1998; 13(1): 1-8.
18. Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu ST, da Cruz AB, et al. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 2008; 26(9): 2266-74.
19. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 55-70.
20. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
21. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-7.
22. Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp Cell Res* 1997; 232(2): 407-11.
23. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151): 318-24.
24. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from

- human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
25. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
 26. Ponzinibbio MV, Crudeli C, Peral García P, Seoane A. Cytogenetic and cytomolecular delayed damage induced in human fibroblasts by low X-ray doses. *BAG, J Basic Appl Genet* 2008; 19(1): 35-41.
 27. Minina I, Zhdanova NS, Shilov AG, Tolkunova EN, Liskovykh MA, Tomilin AN. [Chromosomal instability of in vitro cultured mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells]. *Tsitologiya* 2010; 52(5): 420-5.
 28. Chen J, Shi ZP, Dong J, Liao TT, Wang YP, Sun XP, et al. Evaluation of x-inactivation status and cytogenetic stability of human dermal fibroblasts after long-term culture. *Int J Cell Biol* 2010; 2010: 289653.
 29. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 2011; 8(1): 106-18.
 30. Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7336): 63-7.
 31. Hussein SM, Batada N, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011; 471: 58-62.
 32. Allahbakhshian-Farsani M, Abdian N, Ghasemi-Dehkordi P, Sadeghiani M, Saffari-Chaleshtori J, Hashemzadeh-Chaleshtori M, et al. Cytogenetic analysis of human dermal fibroblasts (HDFs) in early and late passages using both karyotyping and comet assay techniques. *Cytotechnology* 2014; 66(5): 815-22.

A Study of Cytogenetic Stability of Induced Pluripotent Stem Cells Using Karyotyping and Comet Assay Techniques

Payam Ghasemi-Dehkordi, M.Sc.¹, Mehdi Allahbakhshian-Farsani, Ph.D.², Narges Abdian, Ph.D.¹,
Hamideh Jafari-Ghahfarokhi, M.Sc.¹, Javad Saffari-Chaleshtori, M.Sc.³, Marzieh Sadeghiani, M.Sc.¹,
Amin Mirzaeian, B.Sc.¹, Morteza Hashemzadeh-Chaleshtori, Ph.D.^{4*}

1. Research Assistant, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
2. Associate Professor, Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Research Assistant, Clinical Biochemistry Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Sharekord, Iran
4. Professor, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

* Corresponding author; e-mail: biotechnologyskums@gmail.com

(Received: 8 March 2014 Accepted: 16 July 2014)

Abstract

Background & Aims: Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have the capability to undergo unlimited self-renewal and differentiation into all cell types in the body. These cells are artificially derived from a non-pluripotent cell, typically human dermal fibroblasts (HDFs). The study of cytogenetic stability of these cells, in order to use iPS cells and apply studies in therapeutic applications, is essential.

Methods: In the present experimental study, HDFs were isolated and cultured from human foreskin samples. The cytogenetic stability of these cells was evaluated in early passages (1-3) of HDFs using karyotype test and alkaline comet assay technique. The HDF cells treatment with hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as a positive control for alkaline comet assay. The iPS cells with low passage (4-7) derived from reprogrammed HDFs were cultured on mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder layer and cytogenetic stability of these cells were evaluated in early passages using karyotype test and alkaline comet assay technique.

Results: The iPS cells in early passages (4-7) had normal karyotype (46, XY) and DNA damage and comet were not observed in these cells. In addition, HDF cells showed normal karyotype in early passages (1-3), but using comet assay, abnormality and DNA damages were observed in positive control (HDFs treated with H₂O₂). The comparison of alkaline comet assay parameters of iPS and HDF cells with positive control group showed statistically significant differences ($P < 0.05$).

Conclusion: Since the comet assay is a sensitive technique for finding DNA damage, it is best if cytogenetic stability of these cells were evaluated before performing functional experiments on iPS cells. Therefore, for the precise evaluation of DNA damage and cytogenetic stability of iPS cells, the two techniques could complement each other.

Keywords: Induced pluripotent stem cells (IPSC), Human dermal fibroblasts (HDF), Karyotype test, Comet assay

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(4): 370-384